

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA COMO UNA ALTERNATIVA PARA EL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA EN LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES: APLICACIÓN A ORGANISMOS MARINOS

Araceli PEÑA¹, Johanna MORALES², Carmen LABASTIDA¹ y Santiago CAPELLA¹

¹Laboratorio de Cromatografía, DEPg Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, DF, México. arpeal@servidor.unam.mx

²Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510 DF, México.

(Recibido mayo 2002, aceptado enero 2003)

Palabras clave: extracción en fase sólida, determinación de HAP, cromatografía de gases de hidrocarburos aromáticos policíclicos, contaminación en organismos marinos.

RESUMEN

Debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) han sido estudiados ampliamente. La determinación de los HAP en tejidos de organismos marinos requiere de métodos adecuados para su extracción, identificación y cuantificación, ya que este tipo de matrices contiene mezclas complejas de compuestos de naturaleza lipofílica que interfieren en el análisis de los HAP. El procedimiento estándar para la determinación de estos compuestos consume mucho tiempo principalmente el paso de limpieza antes del análisis por CG y/o CG-EM. En este estudio se compara el procedimiento tradicional de purificación por cromatografía en columna abierta con la extracción en fase sólida (EFS) en cartuchos para la determinación de HAP en organismos marinos por cromatografía de gases (CG). El método propuesto se aplicó a tejidos de organismos marinos (pescado, camarón y ostión). Las muestras de tejido liofilizado se saponificaron con KOH en metanol y se extrajeron con hexano. El extracto así obtenido se purificó por ambos procedimientos. El método de purificación tradicional se llevó a cabo en columnas empacadas con gel de sílice, alúmina, sulfato de sodio anhidro y cobre activado. La EFS se realizó en cartuchos comerciales de aminopropil (LC-NH₂) y gel de sílice (Spe-ed Silica-gel). Los extractos que se obtuvieron se analizaron por CG y los resultados se confirmaron por CG-EM. La identificación de los HAP se realizó comparando los tiempos de retención con estándares externos y la cuantificación a través del factor de respuesta calculado para cada uno de los HAP. Los porcentajes de recuperación de los HAP se estimaron utilizando tejido de pescado fortificado. Los resultados que se generaron en ambos procedimientos fueron comparados. El porcentaje de recuperación de los HAP en la fracción aromática fue 42.90 ± 2.80 % utilizando el procedimiento de purificación por cromatografía en columna, 56.87 ± 6.23 % para LC-NH₂ y 58.56 ± 4.89 % en sílice. El límite de detección del método propuesto fue de 75 ppb para 15 HAP y de 250 ppb para naftaleno. El método de EFS utilizando cartuchos de aminopropil presenta ventajas sobre el procedimiento de purificación convencional, ya que se obtienen extractos libres de los principales compuestos que interfieren en su análisis, además de reducir el consumo de disolventes, los tiempos de análisis y los costos del mismo.

Key words: solid phase extraction, determination of PAH, GC of PAH, pollutants of the marine organisms

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are widespread contaminants of the marine environment. This class of compounds has been widely studied because of its carcinogenic and mutagenic character. For the determination of PAH in marine organisms have been developed different methods for the extraction, identification and quantitation of these analytes. This kind of matrixes has complex compounds mixtures with lipophilic character that interfere in the analysis of PAH. The standard procedure for the determination of these compounds in marine organisms is time consuming mainly the clean up procedure before GC or GC-MS analysis. In this contribution, the clean up procedures by open column chromatography and solid phase extraction (SPE) are compared for the determination of PAH in marine organisms by GC. The proposal method was applied to marine organisms as fish, shrimps and oyster. The freeze-dried organism tissue was digested in methanolic KOH and was extracted with hexane. The extract was purified by both procedures. The traditional clean up method was carried out in columns packed with silica gel, alumina, anhydrous sodium sulfate and activated copper. The SPE was performed by commercial LC-NH₂ and Spe-ed Silica-gel cartridges. The final extracts were analyzed by GC and the results were confirmed by GC-MS. PAH identification was made by comparison of retention times with external standards and the quantification was made by response factors of each PAH. The recoveries of PAH were estimated using spiked fish tissue. The results of both procedures were compared. The recovery percentage of PAH in the aromatic fraction was 42.90 ± 2.80 % for column chromatography, 56.87 ± 6.23 % to LC-NH₂ and 58.56 ± 4.89 % to Spe-ed Silica-gel. The detection limit for the proposal method was 75 ppb to 15 PAH and to naphthalene 250 ppb. The SPE method presents advantages over the conventional clean up procedure: a cleaner extract, free of the main interfering compounds was obtained and the cost and time of analysis were reduced.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se originan de la combustión incompleta o pirólisis de la materia orgánica, por la actividad natural o antropogénica. Por diagénesis o biosíntesis se producen cantidades muy pequeñas (NRCC 1983). Factores tales como tipo y cantidad de combustible, temperatura, duración de la combustión y disponibilidad de oxígeno determinan la naturaleza y grado de formación de HAP.

En el ambiente, en general, los HAP son considerados contaminantes prioritarios (Soniassy *et al.* 1994), debido a sus propiedades carcinogénicas. En la mayoría de los casos las determinaciones se limitan al análisis de 16 compuestos (**Tabla I**) en matrices como agua potable, industrial y de desecho, sedimentos, suelos, partículas atmosféricas, así como en tejidos biológicos. Dentro de los ambientes acuáticos los HAP sufren una serie de procesos de intemperización (físicos, químicos y biológicos), tales como evaporación, oxidación fotoquímica, degradación microbiana, dispersión y disolución en el agua (Neff 1979, Green y Trett 1989). Los HAP se asocian fácilmente con la materia particulada y finalmente se depositan en el sedimento (Farrington *et al.* 1983, Farrington 1991, Jackson *et al.* 1994, Witt 1995, Hellou 1996). A través del agua, de los sedimentos o del material suspendido, los organismos marinos son expuestos a los HAP. Organismos como mejillones y ostiones, acumulan altas concentraciones de contaminantes debido a que sus ta-

sas metabólicas son menores (Lee *et al.* 1972, Livingstone *et al.* 1989, Stegeman y Lech 1991). Como consecuencia de ello han sido utilizados como organismos centinelas e integradores de las condiciones de la calidad del agua en los ecosistemas marinos ya que proveen información útil acerca del potencial de biomagnificación en las cadenas tróficas (Mason 1987, Burns y Knapp 1989).

La dificultad en la interpretación y comparación de los resultados en estas matrices (tejidos biológicos) se debe a que los HAP son lipofílicos (Christie 1987, Chu Fu-Lin *et al.* 1997), por lo que la elección de la metodología analítica (procedimiento de extracción y limpieza) dependerá de las características físico-químicas de los analitos, el límite de detección requerido, el nivel y tipo de interferencias, la resolución que se requiere, precisión y exactitud de los instrumentos disponibles, tiempo de análisis y costo.

Los análisis generalmente se realizan por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) con detector UV con arreglo de diodos, HPLC con detector de fluorescencia o HPLC con ambos detectores en serie (Lee *et al.* 1981, Garrigues *et al.* 1987, Kicinski *et al.* 1989, Gratzfeld *et al.* 1993). Independientemente de la matriz en donde se realice el análisis, se requiere la purificación del extracto para eliminar los compuestos interferentes antes del análisis cromatográfico. La mayoría de los estudios realizados llevan a cabo este procedimiento por cromatografía en

TABLA I. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLINUCLEARES

Nombre (abreviaturas, en inglés)	Fórmula	P.M. g/mol	P.F. °C	P.E. °C	V ^M cm ³ /mol	F a 25 °C	P ^S	S g/mol	LogK _{ow}	H
Naftaleno (NA)		128.19	80.5	218	148	0.2830	10.4	31	3.37	43.01
Acenaftileno (Ay)		152.20	95.0	270	—	—	0.89	—	—	—
Acenafteno (AE)		154.21	96.2	277	173	0.1980	0.30	3.8	4.00	12.17
Fluoreno (F)		166.20	116	295	188	0.1260	0.09	1.9	4.18	7.87
Fenantreno (PA)		178.20	101	339	199	0.1770	0.02	1.1	4.57	3.24
Antraceno (A)		178.20	216	340	197	0.0129	0.001	0.045	4.54	3.96
Pireno (P)		202.26	156	360	214	0.0506	0.0006	0.132	5.18	0.92
Fluoranteno (Fl)		202.26	111	375	217	0.1410	1.2 x 10 ⁻³	0.26	5.22	1.03
Criseno (CH)		228.30	255	448	179	0.0053	5.3 x 10 ⁻⁷	—	1.64	5.86
Benzo(a)antraceno (BaA)		228.30	160	435	248	0.0462	2.8 x 10 ⁻⁵	0.0482	5.91	0.58
Benzo(b)fluoranteno (BbF)		252.32	168	481	268	0.0385	—	0.0015	5.80	—
Benzo(k)fluoranteno (BkF)		252.32	217	481	268	0.0126	5.2 x 10 ⁻⁸	0.0008	6.00	0.016
Benzo(a)pireno (BaP)		252.32	175	495	263	0.0328	7 x 10 ⁻⁷	0.0038	6.04	0.046
Benzo(ghi)perileno (BP)		276.34	277	525	277	0.0032	—	2.6 x 10 ⁻⁴	6.50	0.075
Dibenz(a,h)antraceno (DA)		278.36	270	524	300	0.0040*	3.7 x 10 ⁻¹⁰	0.0006	6.75	—
Indeno(1,2,3-cd)pireno (IP)		276.00	164	—	—	—	1.3 x 10 ⁻⁸	5.3 x 10 ⁻⁴	6.40	—

* a 267 °C

P.M. = Peso molecular

V^M = Volumen molar

S = Solubilidad

P.F. = Punto de fusión

F = Proporción de fugacidad

Log K_{ow} = Coeficiente de partición octanol/agua

P.E. = Punto de ebullición

P^S = Presión de vapor

H = Constante de la ley de Henry

columna abierta empacada con alúmina, florisil y/o sílica (Wise *et al.* 1997) y en algunos casos una segunda purificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (Baumard *et al.* 1997, 1998). A través del proceso de adsorción se separan los analitos que interfieren en el análisis con intervalos de polaridad bien definidos y estrechos. Entre las desventajas que presenta este procedimiento se incluyen los cambios de actividad en los adsorbentes, el uso de grandes volúmenes de disolventes de alta pureza que deben ser evaporados para concentrar los analitos de interés, así como el tiempo total del análisis.

El análisis de HAP en organismos es particularmente difícil debido a la baja concentración de los compuestos individuales (algunos en ng/g) ya que generalmente la cantidad de materia disponible (algunos gramos) es limitada. El pretratamiento de la muestra antes del análisis cromatográfico es largo, en algunos casos el tiempo de extracción de los HAP dura hasta 56 horas (Al-Saad 1996), por lo que se requieren procesos de purificación y preconcentración más eficientes, confiables y rápidos. La extracción en fase sólida (EFS) con cartuchos comerciales resulta una alternativa para este procedimiento debido a la reducción del volumen de disolventes, tiem-

po de análisis, costos del mismo y una mayor variedad de fases estacionarias de diferente polaridad.

Las fases estacionarias empleadas en la EFS son similares a las utilizadas en cromatografía de líquidos. De acuerdo con el carácter químico del grupo funcional unido a la sílice o al copolímero, las fases resultantes se pueden clasificar en: no polares, polares o de intercambio iónico. La elección de los disolventes utilizados depende de la naturaleza de la fase estacionaria (Berrueta *et al.* 1995).

El objetivo de esta investigación fue proponer y evaluar la EFS utilizando cartuchos comerciales de LC-NH₂ y Spe-ed Silica-gel como procedimiento alternativo de purificación en la metodología analítica para la determinación de HAP en organismos marinos. Dicho procedimiento fue comparado con el método tradicional utilizado (cromatografía en columna abierta) en términos de precisión y recuperación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Hexano 99 % (grado cromatográfico) de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Pentano (RA) de E. Merck (Darmstadt, Alemania). Metanol (RA), Tolueno (RA), cloruro de metileno (RA) de Mallinckrodt J.T. Baker, México. Benceno (RA) de E. Merck (México). Cobre granular (20-30 mallas) de J.T. Baker (Pittsburgh, EUA). Sulfato de sodio anhidro (RA) de Mallinckrodt J.T. Baker, México. Óxido de aluminio 90 (Al₂O₃) (grado cromatográfico) (0.063-0.200 mm) secado durante 6 h a 350 °C y parcialmente desactivado a 1 % (v/p). Sílica gel 60 (grado cromatográfico) (0.063-0.200 mm) se secó toda la noche a 150 °C y parcialmente desactivada a 3 % (v/p). Cartuchos para EFS Supelclean™ LC-NH₂ (500 mg/3mL), de Supelco Park (Bellefonte, EUA). Cartuchos para EFS Spe-ed Silica-gel (500 mg/3mL) de Applied Separations (Leningh Valley, EUA). Mezcla estándar de hidrocarburos aromáticos policíclicos (16 HAP, 2000 ig/mL en cloruro de metileno-benceno 50:50 (v/v) de Chem. Service Co. (Western Chester, EUA).

Muestras

La muestra de pescado que se utilizó para desarrollar y optimizar el método se compró en el supermercado (peso húmedo 65.99 g por individuo). Como aplicación del método desarrollado se colectó pescado (Familia Mucrouidae con peso húmedo de 66.3 g) en Boca del Río Coatzacoalcos, Veracruz, México, los camarones (*Penaeus duorarum*, 21 individuos con un peso total de 130.5 g sin exoesqueleto) en la Laguna de Términos, Campeche, México y los ostiones se compraron en el supermercado (25 individuos con peso húmedo total de 111.97 g).

Preparación de la muestra

1.0 gramo de tejido de pescado previamente liofilizado (4.89 g peso húmedo) se fortificó con 25 µL de la solución estándar de HAP (20 µg/mL en tolueno), con una concentración final de 500 ng/g. La muestra se puso a digestión en un equipo Soxhlet por 4 horas bajo reflujo con 50 mL de una solución metanólica de KOH al 20 % (p/v). Después de enfriarse, se extrajo cuatro veces con 25 mL de hexano, colectándose estos extractos y secándose con Na₂SO₄ anhidro. Posteriormente se llevaron a 2 mL aproximadamente utilizando un rotavapor y se ajustó con hexano al volumen final. La purificación del extracto se realizó por cromatografía en columna y por EFS utilizando cartuchos comerciales.

Purificación por cromatografía en columna abierta

La purificación del extracto se realizó utilizando una columna de vidrio de 10 x 300 mm empacada con una relación 1:4 v/v de sílica gel (2.5 g) y alúmina (10 g), 1.0 g de Na₂SO₄ anhidro y 1.0 g de cobre activado. La columna se lavó con hexano antes de la purificación del extracto. El extracto se colocó en la columna eluyendo la fracción alifática con 100 mL de hexano y la aromática (donde preferentemente se extraen los HAP) con 100 mL de benceno. Cada fracción se colectó por separado y cuidadosamente se llevó a sequedad. Posteriormente se redisolviéron con 2 mL de hexano y 1.0 µL de cada fracción se inyectó en el cromatógrafo. Se siguió el procedimiento propuesto por IOCARIBE (1987) sin realizar ninguna modificación con el fin de comparar los resultados obtenidos con los de la EFS.

Purificación por EFS

Se utilizaron cartuchos comerciales de Supelclean™ LC-NH₂ (aminopropil, aproximadamente 5% C, 500 mg/3 mL) y Spe-ed Silica-gel (500 mg/3 mL) para la purificación del extracto. Ambos cartuchos se acondicionaron antes de ser utilizados, con el fin de solvatar las moléculas del adsorbente y de esta forma favorecer su interacción con los analitos que se requiere retener (Berrueta *et al.* 1995). Para condicionarlos se utilizaron sucesivamente 2 mL de hexano, 2 mL de cloruro de metileno y 2 mL de hexano. Posteriormente, el extracto a purificar se colocó en el cartucho y se eluyeron dos fracciones. Primero la alifática con 2 mL de pentano y después la aromática con 2 mL de tolueno. La elusión se realizó a una velocidad aproximada de 0.2 mL/min. El volumen final de cada fracción fue de 2 mL y se inyectó 1.0 µL, de cada una de ellas, en el cromatógrafo.

Análisis por cromatografía de gases (CG)

Las fracciones alifática y aromática de ambos procedimientos se analizaron por CG usando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Modelo 5890 Serie Plus equipado con un sistema de inyección en columna, control

electrónico de presión y detector de ionización de flama. Los análisis se efectuaron en columna capilar de sílice fundida de PTE™-5 Supelco (30 m X 0.25 mm d.i. X 0.25 µm). La temperatura del inyector se mantuvo 3 °C arriba de la del programa de la columna. El programa de temperatura fue: 60 °C, durante 1 min e incrementos de 20 °C/min hasta 250 °C y 5 °C/min a 320 °C durante 20 min. El flujo de He fue constante (2 mL/min).

Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)

La confirmación de los HAP se realizó por CG-EM utilizando un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 equipado con un inyector "split/splitless". La temperatura del inyector fue 250 °C. La columna capilar utilizada fue DB-5, J&W Scientific (30 m X 0.25 mm d. i. X 0.25 µm). El programa de temperatura utilizado: 60 °C, durante 1 min, con incrementos de 15 °C/min, hasta 300 °C, durante 20 min. El modo de inyección fue splitless (1 min). El gas acarreador fue He con flujo de 1 mL/min. El cromatógrafo está acoplado a un detector selectivo de masas HP 5971. La temperatura de la línea de transferencia fue 280 °C, la de la fuente de ionización 175 °C, analizador (cuadrupolar) 150 °C y el detector 75 °C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico (70 eV). Se utilizaron el modo de barrido total del espectro (SCAN) de 50-550 m/z a 1.5 scan.s⁻¹ y el selectivo de iones (SIM), las señales adquiridas fueron el ión molecular y dos iones fragmento de cada compuesto a 2.8 ciclos s⁻¹.

Optimización de la metodología

Cada muestra se preparó por triplicado y cada fracción obtenida se inyectó por triplicado al cromatógrafo. Se realizaron 3 blancos de matriz utilizando tejido de pescado sin fortificar, también se analizó un blanco de reactivos para verificar posibles fuentes de contaminación e interferencia. La linealidad del método desarrollado se determinó con muestras de tejido de pescado fortificado. Las concentraciones utilizadas fueron 75, 100, 250, 500 y 750 ppb. La purificación de los extractos se realizó en EFS con cartuchos de aminopropil, obteniendo un extracto de cada concentración en estudio. Los extractos se inyectaron tres veces en el CG, determinando las curvas de calibración de los HAP.

Identificación y cuantificación de los HAP

La identificación de los HAP se realizó comparando los tiempos de retención y se cuantificaron utilizando factores de respuesta de los diferentes compuestos, los cuales se calcularon inyectando seis veces la solución estándar (250 ppb en tolueno) con los 16 HAP incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de EUA (USEPA 1990). Para confirmar la presencia de los HAP se inyectaron las muestras por CG-EM utilizando el modo de barrido total

del espectro (SCAN) y monitoreo selectivo de iones (SIM).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos pasos más críticos en el análisis de los HAP en muestras biológicas son la extracción de los HAP y la purificación del extracto. Los métodos de digestión y de extracción líquido-líquido después de la saponificación, han sido los más utilizados para la determinación de los HAP en matrices comestibles y muestras de tejidos biológicos, por lo tanto se siguió este procedimiento para el tejido de pescado. La purificación del extracto de pescado fortificado con HAP se realizó siguiendo el método tradicional por cromatografía en columna abierta (IOCARIBE 1987) por ser uno de los más utilizados en la determinación de HAP en organismos marinos, esto se realizó sin ninguna modificación con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con el método propuesto por EFS. En este procedimiento se obtuvieron dos fracciones: la alifática que se eluyó con hexano conteniendo principalmente los hidrocarburos alifáticos y la aromática que se eluyó con benceno conteniendo los HAP. Como muestra la **figura 1** (fracción alifática), los hidrocarburos alifáticos así como los HAP de bajo peso molecular (dos y tres anillos) eluyeron junto con el escualeno. La **figura 2**, muestra el análisis de la fracción aromática y como se esperaba la recuperación de los HAP de dos y tres anillos fue baja. También coeluyeron fenoles y ftalatos, sin

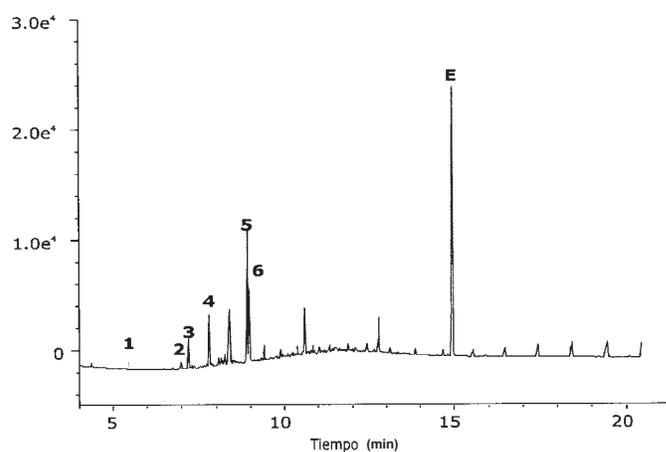


Fig. 1. Cromatograma de la fracción alifática del extracto de pescado fortificado y purificado por cromatografía en columna. Naftaleno (pico 1), acenaftileno (pico 2), acenafteno (pico 3), fluoreno (pico 4), fenantreno (pico 5), antraceno (pico 6), fluoranteno (pico 7), pireno (pico 8), benzo(a)antraceno (pico 9), criseno (pico 10), benzo(b)fluoranteno (pico 11), benzo(k)fluoranteno (pico 12), benzo(a)pireno (pico 13), indeno(1,2,3-cd)pireno (pico 14), dibenzo(a,h)antraceno (pico 15), benzo(g,h,i)perileno (pico 16), escualeno (e), fenoles (pico fe), 2-etil-hexil ftalato (pico ft), desconocido (pico D). Condiciones cromatográficas en el texto.

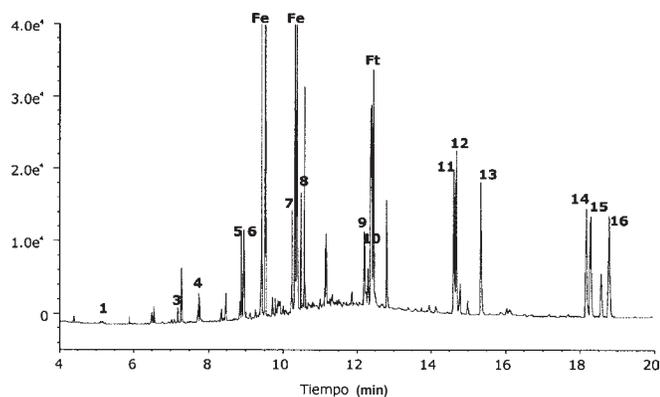


Fig. 2. Cromatograma de la fracción aromática del extracto de pescado fortificado y purificado por cromatografía en columna. Identificación de los picos como se indica en la figura 1. Condiciones cromatográficas en el texto.

embargo, esta fracción está libre de hidrocarburos alifáticos.

La EFS como un proceso de limpieza para el extracto de tejido de pescado se realizó usando cartuchos comerciales de Supelclean™ LC-NH₂ y Spe-ed Silica-gel. La optimización de los disolventes para este procedimiento se basó en lo descrito para cromatografía en columna (Botello y Castro 1983, DeLeon *et al.* 1988, González *et al.* 1992, Alvarez *et al.* 1994, Jackson *et al.* 1994, Quintero y Díaz 1994, Hermida-Ameijeira *et al.* 1995, Al-Saad 1996, Fayad *et al.* 1996, Peña *et al.* 1996, Morales 1998, Baumard *et al.* 1998) para la determinación de los HAP en diferentes matrices. Los disolventes más utilizados para eluir las diversas fracciones durante la purificación por cromatografía en columna abierta fueron pentano y hexano para la fracción alifática, y benceno, tolueno y cloruro de metileno para la fracción aromática. La proporción de los disolventes utilizados variaba de acuerdo con el procedimiento analítico que se seguía en cada uno de los estudios, por lo que se probaron diferentes disolventes y mezclas de ellos para la elución. Al analizar los resultados obtenidos se decidió utilizar pentano para eluir la fracción alifática y tolueno para la fracción aromática. Se prefirió pentano en lugar de hexano (utilizado en cromatografía en columna abierta) debido a que éste eluía algunos HAP, aun considerando que ambos disolventes tienen polaridades similares y que el pentano es más volátil. El tolueno se seleccionó en lugar del benceno debido a su menor toxicidad y a su selectividad por los HAP. Las **figuras 3 y 4** muestran el análisis de la fracción alifática de la purificación con aminopropil (LC-NH₂) y sílica (Spe-ed Silica-gel) que se obtiene del extracto de pescado fortificado. Como se observa en los cromatogramas, la EFS permite una mejor purificación si se compara con la obtenida por cromatografía en columna (**Fig. 1**). Al realizar la purificación con cartuchos de Spe-ed Silica-gel (**Fig. 4**) se observa un perfil típico de

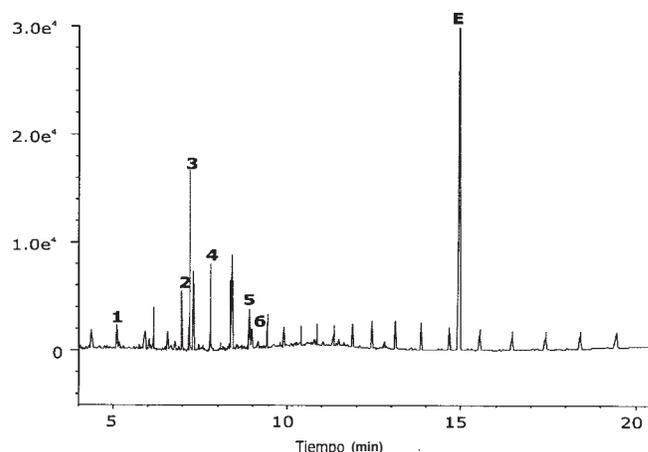


Figura 3. Cromatograma de la fracción alifática del extracto de pescado fortificado y purificado por EFS (LC-NH₂). Identificación de los picos como se indica en la figura 1. Condiciones cromatográficas en el texto.

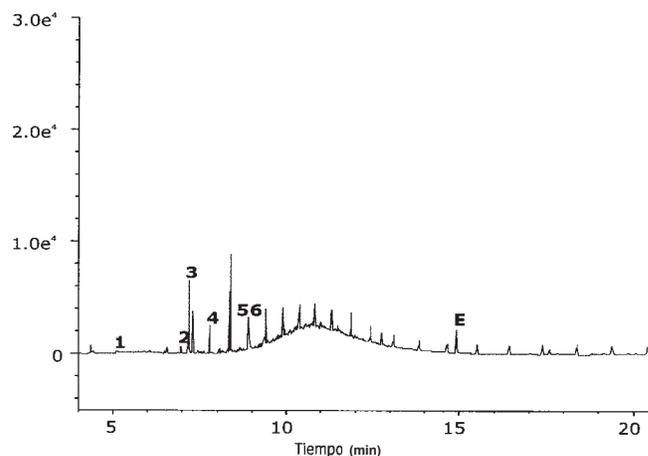


Figura 4. Cromatograma de la fracción alifática del extracto de pescado fortificado y purificado por EFS (Spe-ed Silica gel). Identificación de los picos como se indica en la figura 1. Condiciones cromatográficas en el texto.

aceite mineral, sin embargo los HAP de bajo peso molecular como naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno también eluyeron. El análisis de la fracción aromática se muestra en las **figuras 5 y 6**. De estos cromatogramas es claro que la fracción obtenida en la purificación por EFS está casi libre de otros compuestos y en ambos casos (cartuchos LC-NH₂ y Spe-ed Silica-gel) el naftaleno no se detectó. El uso de cartuchos LC-NH₂ permite obtener mejor purificación libre de compuestos endógenos y elimina la necesidad de una segunda purificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (Baumard *et al.* 1997).

La recuperación de los HAP en las fracciones alifáticas obtenidas por cromatografía en columna y EFS en cartuchos se muestra en la **figura 7**. La recuperación y la variación promedio de estos compuestos fue alta, proba-

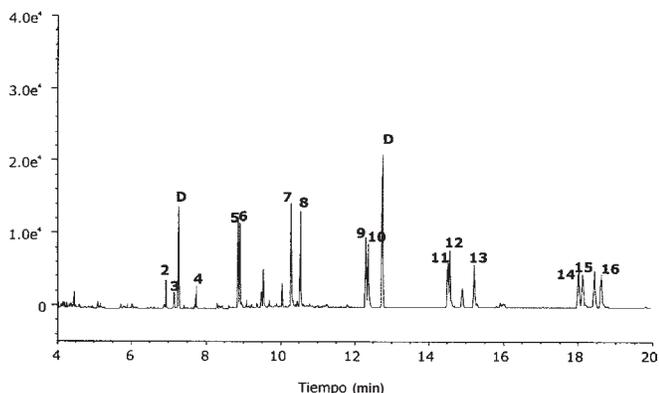


Figura 5. Cromatograma de la fracción aromática del extracto de pescado fortificado y purificado por EFS (LC-NH₂). Identificación de los picos como se indica en la figura 1. Condiciones cromatográficas en el texto.

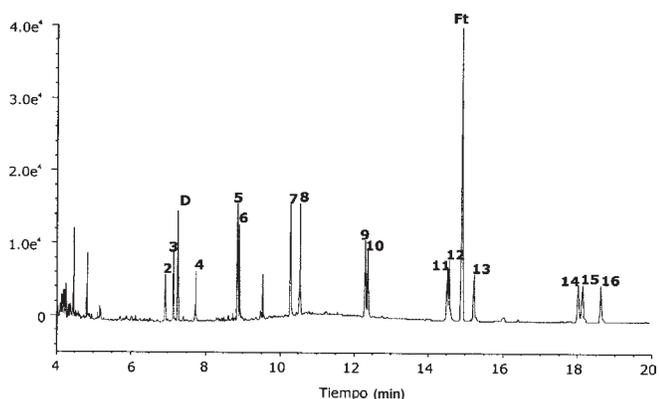


Figura 6. Cromatograma de la fracción aromática del extracto de pescado fortificado y purificado por EFS (Spe-ed Silica gel). Identificación de los picos como se indica en la figura 1. Condiciones cromatográficas en el texto.

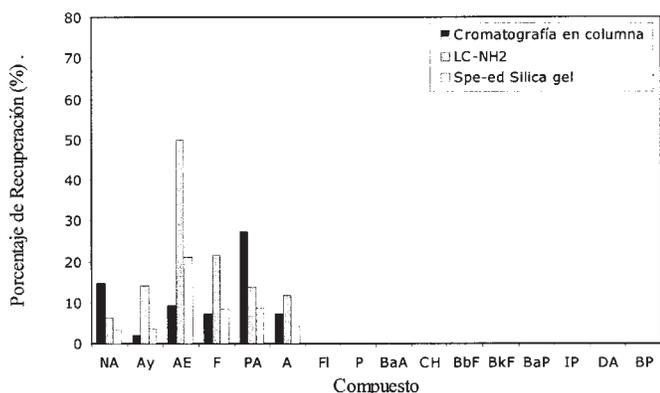


Figura 7. Recuperación de HAP en las fracciones alifáticas (n=3)

blemente debido a que los HAP más ligeros son muy volátiles y probablemente se pierden en la evaporación del procedimiento. En la **figura 8** y la **tabla II** se ilustra la recuperación de los HAP en la fracción aromática de

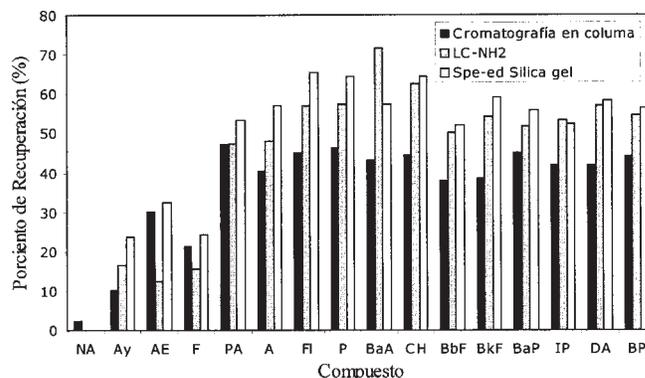


Figura 8. Recuperación de HAP en las fracciones aromáticas (n=3)

ambos procedimientos. En este caso la precisión expresada por el coeficiente de variación muestra que todos los HAP excepto el fluoreno presentan un valor de CV menor al utilizar EFS con cartuchos de aminopropil y cartuchos de Spe-ed Silica-gel que con cromatografía en columna. El CV disminuye considerablemente a partir de los HAP de cuatro anillos, como en el caso del dibenzo(a,h)antraceno con un CV=0.42 en el caso de utilizar cartuchos de aminopropil. Como se muestra en la **figura 8** la recuperación de los HAP usando EFS en cartuchos (LC-NH₂ y Spe-ed Silica gel) es mejor que la obtenida por cromatografía en columna para la mayoría de los HAP excepto: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno y fenantreno.

Se compararon estadísticamente los datos obtenidos, a través de un análisis de varianza (ANOVA de un factor), demostrándose que existen diferencias entre los diferentes procedimientos de purificación: $F_{2,27}=31.4$. Valor crítico $F_{2,27}=19.5$ ($P = 0.05$), donde el subíndice 2 son los grados de libertad entre los procedimientos de purificación (h-1) y el subíndice 27 son los grados de libertad dentro de los procedimientos (h(n-1)). La diferencia es significativa entre el procedimiento de purificación por cromatografía en columna y la EFS en cartuchos, sin embargo entre los dos diferentes adsorbentes utilizados en la EFS los valores del porcentaje de recuperación son similares, por ello se aplicó una prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales y se observó que no existen diferencias entre el porcentaje de recuperación obtenido con aminopropil y sílica gel: $t_{18,2} = -0.67$ (valor calculado). Valor crítico $t = 2.10$ ($P = 0.05$). Donde el subíndice 18 son los grados de libertad ($n_1 + n_2 - 2$) y 2 el número de colas utilizado. Sin embargo, la EFS con cartuchos de aminopropil permite obtener extractos más libres de interferencias que con cartuchos de sílica gel, por lo que el primero fue el método de purificación de los extractos para el análisis de HAP en organismos marinos.

La linealidad del método mostró un rango con un coeficiente de correlación aceptable (0.9525-0.9941) para

TABLA II. RECOBRO (%) Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO (N = 3)

Compuesto	Cromatografía en columna		EFS (LC-NH ₂)		EFS (Spe-ed Silica gel)	
	R* (%)	C.V.	R*(%)	C.V.	R*(%)	C.V.
Naftaleno	2.44	34.43	0.00	—	0.00	—
Acenaftileno	10.20	69.05	16.65	23.94	23.63	44.50
Acenafteno	30.27	31.97	12.34	30.29	32.46	37.95
Fluoreno	21.54	13.08	15.52	31.79	24.33	27.59
Fenantreno	47.45	22.09	47.17	14.77	53.23	10.42
Antraceno	40.47	21.72	47.84	13.96	56.97	12.88
Fluoranteno	45.03	24.28	56.96	5.56	65.48	12.71
Pireno	46.44	23.51	57.34	6.54	64.47	12.94
Benzo(a)antraceno	43.15	20.84	71.55	22.57	57.41	8.27
Criseno	44.40	20.79	62.53	10.60	64.51	11.11
Benzo(b)fluoranteno	37.88	21.56	50.01	5.11	51.88	7.03
Benzo(k)fluoranteno	38.70	23.53	54.03	4.87	59.03	6.73
Benzo(a)pireno	45.23	23.58	51.57	3.17	55.76	4.78
Indeno(1,2,3-cd)pireno	42.13	21.30	53.30	3.96	52.36	8.87
Dibenzo(a,h)antraceno	41.90	28.82	56.91	0.42	58.29	2.94
Benzo(ghi)perileno	44.10	21.83	54.52	6.35	56.41	3.78

* R = recuperación promedio, C.V. = coeficiente de variación

los HAP en estudio. Para obtener el límite de detección se consideró la concentración del analito que proporcionará una señal igual a la del blanco (ruido) más dos veces la desviación estándar del blanco. El límite de detección fue 75 ng/g para todos los HAP analizados a excepción del naftaleno que fue de 250 ng/g.

El porcentaje de recuperación de los HAP obtenido con este protocolo se considera aceptable comparado con el reportado por Baumard *et al.* (1997), para esta compleja matriz. Probablemente, las principales pérdidas de HAP son en el paso de saponificación y en la evaporación, siendo altas las pérdidas de HAP de bajo peso molecular.

El protocolo desarrollado se aplicó al análisis de muestras de pescado (Fam. Mucrouoridae) y camarón (*Penaeus duorarum*) que fueron capturados en regiones consideradas “contaminadas” y a una muestra de ostión adquirida en el supermercado (características descritas en Materiales y métodos). En el caso del pescado en la fracción alifática no se identificó ningún HAP, sin embargo, mostró una mezcla compleja no resuelta la cual es considerada como una consecuencia de la exposición de los organismos al petróleo crudo, intemperizado, degradado y sus derivados (Peña *et al.* 1996). En el análisis por CG-EM de esta fracción se identificaron compuestos como: fenol 2,6-bis (1,1-dimetil)etil)-4 metil, hidrocarburos alifáticos y escualeno. En la fracción aromática se identificaron y cuantificaron por CG: antraceno (0.88 ± 0.14 µg/g peso seco) y pireno (0.087 ± 0.002 µg/g peso seco) y por CG-EM se confirmó su presencia (Fig. 9).

Los resultados de cuantificación se presentan en peso seco, µg/g de tejido liofilizado lo que corresponde a 4.89 g de tejido húmedo para pescado. Como ya se indicó el método propuesto fue desarrollado utilizando tejido de pescado fortificado, sin embargo al aplicarse a muestras de camarones y ostiones se obtuvieron extractos libres de interferencias y en el análisis de la fracción alifática del tejido de camarones se identificaron por CG-EM hidrocarburos alifáticos, fenol y escualeno y en la fracción aromática se identificaron por CG: fluoreno, fenantreno y pireno. La presencia de los HAP identificados se confirmó por CG-EM (Fig. 10). También se analizaron muestras de ostión por ser considerado de interés en los estudios de monitoreo ambiental. No se detectaron HAP ya que estos organismos eran destinados para consumo humano.

CONCLUSIONES

El método desarrollado, usando EFS con cartuchos de aminopropil como un procedimiento de purificación para la determinación de HAP por CG, permite obtener mejor extractos de tejidos biológicos suficientemente libres de compuestos endógenos que los obtenidos con cartuchos de sílica y por el procedimiento de cromatografía en columna abierta y no es necesaria una segunda purificación. La recuperación de los HAP se considera aceptable para este tipo de matrices comparada con la reportada en la literatura (Baumard *et al.* 1997). La reducción

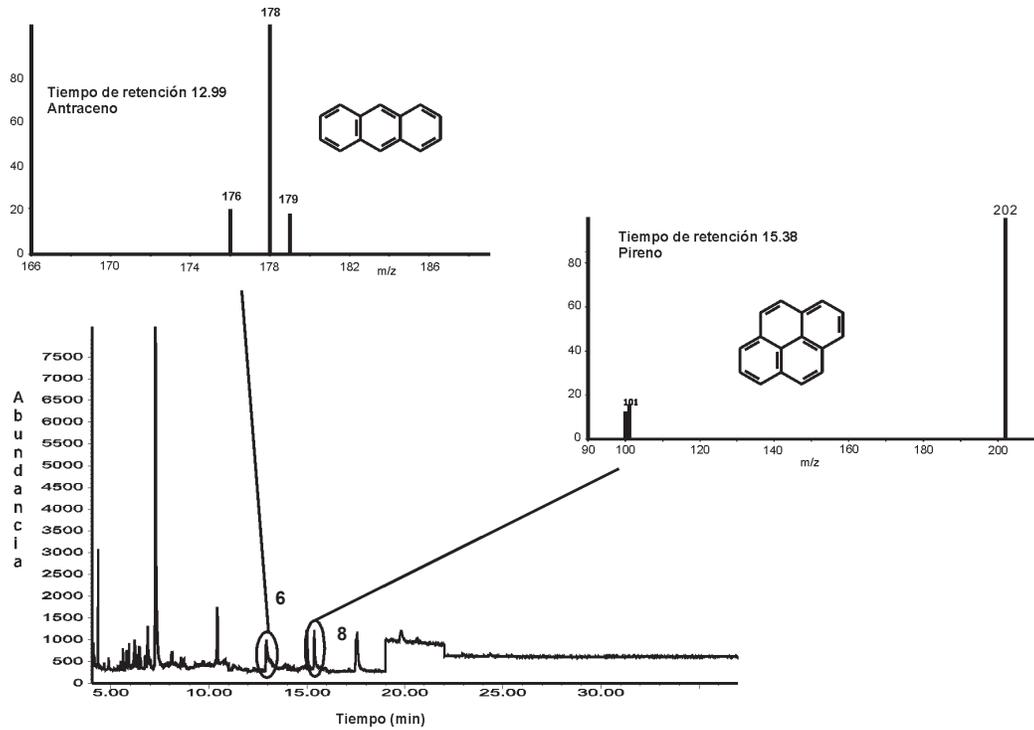


Figura 9. Cromatograma de la fracción aromática de tejido de pescado (Fam. Mucrouidae) purificado por EFS (LC-NH₂). Identificación de los picos como se indica en la figura 1. Condiciones cromatográficas en el texto.

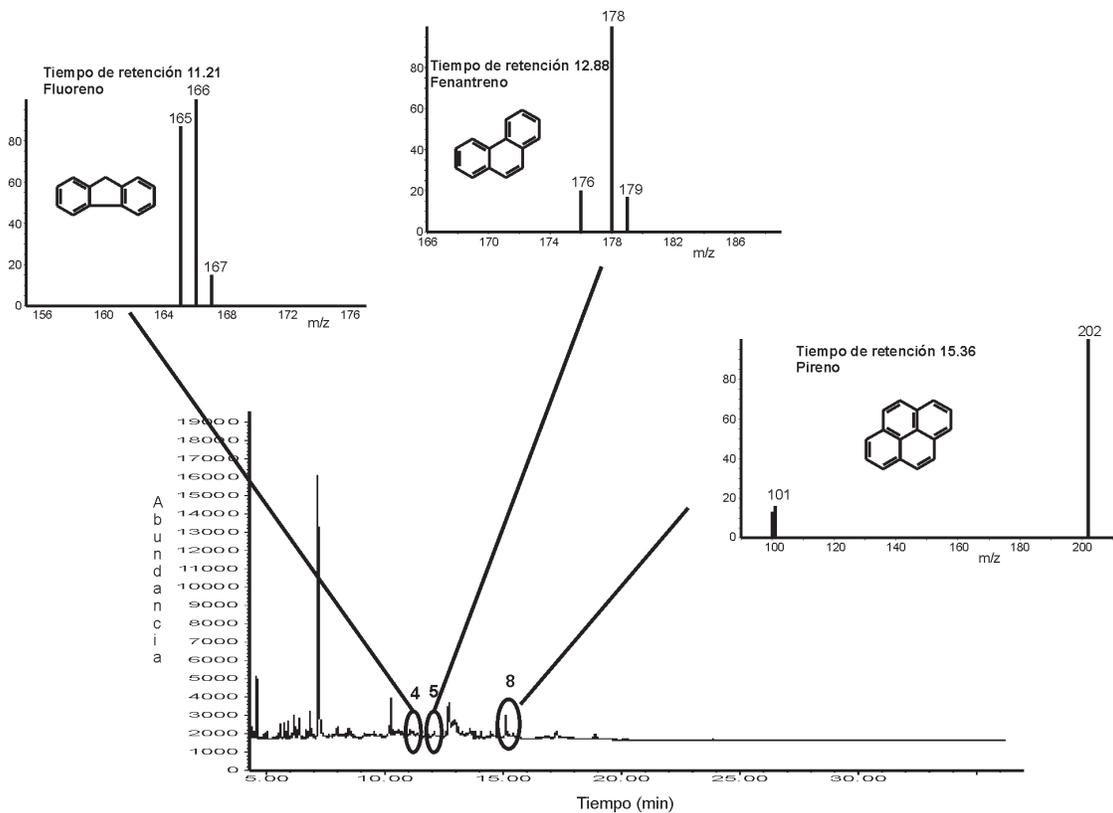


Figura10. Cromatograma de la fracción aromática del camarón *Penaeus duorarum* purificado por EFS (LC-NH₂). Identificación de los picos como se indica en la figura 1. Condiciones cromatográficas en el texto.

del tiempo de análisis y del consumo de reactivos y disolventes es significativa. El método propuesto no se optimizó para camarones y ostiones, sin embargo en todos los casos se obtuvieron extractos libres de interferencias por lo que la identificación de HAP por CG-EM para estos organismos fue confiable.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (DGEP). Agradecemos al Q. Román Pérez Balán (UACAM) por proporcionar algunos reactivos, a la M. en C. Lilia Castro (IMP) por facilitar algunos estándares y a la Dra. Evangelina Camacho por su apoyo técnico (Instituto de Química, UNAM).

REFERENCIAS

- Al-Saad H. T. (1996). Distribution and sources of aliphatic hydrocarbons in fish from the Arabian Gulf. *Mar. Pollut. Bull.* 21, 155-157.
- Alvarez L. T., Gold G. B. y Zapata O. P. (1994). Hydrocarbon concentrations in sediments and clams (*Rangia cuneata*) in Laguna of Pom, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 39-45.
- Baumard P., Budzinski H. y Garrigues P. (1997). Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography to mass spectrometry: application to mussels. *Fresenius J. Anal. Chem.* 359, 502-509.
- Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., Sorbe J.C. y Bellocq J. (1998). Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 12, 951-960.
- Berrueta L. A., Gallo B. y Vicente F. (1995). A review of solid phase extraction: basic principles and new developments. *Chromatographia* 40, 474-483.
- Botello A. V. y Castro S. A. (1983). Levels of organic pollution in coastal lagoons of Tabasco State, México; I: Petroleum. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 271-277.
- Burns K. A. y Knapp A. H. (1989). The Bahia Las Minas Oil Spill. Hydrocarbon Uptake by Reef Building Corals. *Mar. Pollut. Bull.* 20, 391-398.
- Christie W. W. (1987). *Lipid Analysis*. Pergamon Press, 2a. ed. Londres.
- Chu Fu-Lin, Tong Li, Volety A., Constantin G. y Hale R.C. (1997). Lipid class composition of oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to sediment-associated PAHs. *J. Shellfish Res.* 16, 1, 349-350.
- DeLeon I. R., Ferrario J. B. y Byrne C. J. (1988). Bioaccumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by the clam, *Rangia cuneata*, in the vicinity of a creosote spill. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 872-879.
- Farrington J. W., Goldberg E. D., Risebrough R. W., Martin J. H. y Bowen V. T. (1983). A mussel watch 1976-1978. An overview of the trace metal, DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Environ. Sci. Technol.* 17, 490-496.
- Farrington J. W. (1991). Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Environ. Health Perspect.* 90, 75-84.
- Fayad N. M., El-Mubarak A. H., y Edora R. L. (1996). Fate of oil hydrocarbons in fish and shrimp after major oil spills in the Arabian Gulf. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 475-482.
- Garrigues P., Soclo H. H., Marniesse M. P. y Ewald M. (1987). Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (pah) in recent sediments from the continental shelf of the "Golfe de Gascogne" (Atlantic Ocean) and in the Gironde Estuary. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 28, 121-131.
- González C., Botello A. V. y Díaz G. G. (1992). Presence of aliphatic hydrocarbons in sediments and organisms from Campeche Bank, Mexico. *Mar. Poll. Bull.* 24, 267-270.
- Gratzfeld H. A., Schuster R. y Schulenberg-Schell H. (1993). Polynuclear aromatic hydrocarbons by HPLC. *HP Application note* 12-5091-7260E.
- Green J. y Trett M. W. (1989). The fate and effects of oil in freshwater. Elsevier Applied Science. 338p.
- Hellou J. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine mammals, finfish, and molluscs. En: *Interpreting Tissue Concentrations*. (W.N. Beyer, G.H. Heinz y A.W.N. Redman, Eds.) A Special Publication of SETAC, Lewis Publishers, EUA, capítulo 9.
- Hermida-Ameijeira A., Simal J. G., López J. H. y Simal J. L. (1995). Evaluation of the performance of a multiresidue gas chromatographic method for the determination of aliphatic hydrocarbons in mussels of Galicia (NW Spain). *Wat. Res.* 29, 2118-2124.
- IOCARIBE (1987). Manual CARIPOL para el análisis de hidrocarburos del petróleo en sedimentos y organismos marinos, mimeo, Cartagena, Colombia.
- Jackson T. J., Wade T. L., McDonald T. J., Wilkinson D. L. y Brooks J. M. (1994). Polynuclear aromatic hydrocarbon contaminants in oysters from the Gulf of Mexico (1986-1990). *Environ. Pollut.* 83, 291-298.
- Kicinski H. G., Adamek S. y Ketrup A. (1989). Trace enrichment and HPLC analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chromatographia* 28, 203.
- Lee R., Sauerhebel R. y Benson A. A. (1972). Petroleum hydrocarbons; uptake and discharge by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Science* 177, 344-346.
- Lee M. L., Novotny M. V. y Bartle K. D. (1981). Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds. Academic Press, Nueva York.
- Livingstone D. R., Kirchin M. A. y Wiseman A. (1989). Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica* 19, 1041-1062.

- Mason R. P. (1987). A comparison of fluorescence and gas chromatography for the determination of petroleum hydrocarbons in mussels. *Mar. Pollut. Bull.* 18, 528-533.
- Morales J. W. (1998). Análisis de los hidrocarburos presentes en agua, sedimento y organismos de los sistemas fluvio-lagunares Pom-Atasta y Narváez, Campeche-Tabasco. Reporte Final de Servicio Social. CBS, UAM-Xochimilco, DEHA 59 p.
- Neff J. M. (1979). *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Sources, fates and biological effects.* Applied Science Publishers, Essex.
- NRCC (National Research Council of Canada) (1983). *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: formation, sources, fate and effects on aquatic biota.* NRC Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality. Publication No.18981. Ottawa, Ont. 209 p.
- Peña E., Conde J. E. y Montelongo F. G. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons and n-alkanes in *Osilinus attratus* from the coast of Tenerifi (Canary Islands) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 803-810.
- Quintero S. y Díaz C. (1994). Aliphatic hydrocarbons in fish from the Canary Islands. *Mar. Pollut. Bull.* 28, 44-49.
- Stegeman J. J y Lech J. J. (1991). Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Perspect.* 90, 101-109.
- Soniassy R., Sandra P. y Schletl C. (1994). Water analysis. Organic micropollutants. Hewlett-Packard Company, Alemania.
- USEPA (US Environmental Protection Agency) (1990). Compilation of E.P.A's sampling and analysis methods. Compilado por W. Mueller y D. L. Smith (L. D. Keith, Ed.) EUA, 803p.
- Wise S. A., Chesler S. N., Hertz H. S., Hilpert L. R. y May W. E. (1977). Chemically-bonded aminosilane stationary phase for the high-performance liquid chromatographic separation of polynuclear aromatic compounds. *Anal. Chem.* 49, 2306-2310.
- Witt G. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 237-248.